

(19) Országkód:

HU



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG

ORSZÁGOS
TALÁLMANYI
HIVATAL

**SZABADALMI
LEÍRÁS**
SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(11) Lajstromszám:

210 122 B

(21) A bejelentés száma: 1484/88
(22) A bejelentés napja: 1988. 03. 23.

(40) A közzététel napja: 1992. 09. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közönyben: 1995. 02. 28. SZKV 95/02

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 35/60
A 61 K 31/20
A 61 K 33/04
A 61 K 35/72

(72) Feltaláló:

A fehérhollók nevűk feltüntetésének mellőzését kértek,
(HU)

(73) Szabadalmi:

BIOREX Kutaiš-Fejlesztő Kft., Budapest (HU)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54) Eljárás a keringési rendszer és a szív tromboembolitikus állapotaira ható
gyógyászati készítmény előállítására

(57) KIVONAT

A találmány a szívre és a keringési rendszer trombo-
embolitikus állapotira ható gyógyászati készítmények
előállítására vonatkozik. A találmány értelemben
úgy járnak el, hogy 0,5–50 tömeg%-ban szeléntartal-
mú élelmező típusú mikroorganizmust, valamint 99,5-

0,5 tömeg%- 18–24-szénatomos, legalább két ketős
kötések tartalmazó egy vagy több telítetlen zsírsavat
kívánt esetben adalékanyagokkal és antioxidánsnal
együttetek és ismert módon gyógyszerkészítményé
alakítanak.

HU 210 122 B

A találomány tárgya eljárási a keringési rendszer és a szív tromboembolitikus állapotaira ható gyógyszerárt készítmény előállításra.

Ismertes, hogy a C₁₆₋₂₄ ω-3 telítetlen zsírsavak előnyös biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Közülük is kiemelkedő jelentőségű az eikozapentaénsav (EPA) és a dokozahexánsav (DHA). E két sav fontos szigér és sokrétű biológiai hatásának mutatnak rá közelményükben Dyerberg és munkatársai (*The Lancet*, 15, 117/1978).

A politetiletlen zsírsavak, ennek belül elsősorban az EPA és a DHA hipertóniában és trombózisban megbeszélésekben játszott fontos szerepével kapcsolatos hatásokat írják le összefoglalj legelleg Goodnight és munkatársai (*Arteriosclerosis*, 2/87/1982/Rewiew).

Hatóanyagnak EPA-t és DHA-t tartalmazó gyógyszerkészítményeket ismertet például a 3 438 630 sz. német szabadalmi leírás eljárásban a vér koleszterin-szintjének csökkenésére, továbbá ez 5 808 037 és a 6 049 097 sz. japán közrebecsítési iratok szribetegegésben szerevedően trombus kialakulásának megelőzésre és a gyérülékesedésre.

Számos közelmező foglalkozik még az EPA és a DHA véralomelések aggragációjáról és így trombusképződést gátoló hatásáról, így például Spencer és Caranga (Prostagl. Leukotriens and Med. 23, 129/1984) és Knapp és munkatársai (New Engl. Journ. of Med. 314, 937/1986).

A EPA és a DHA vírusellenes hatását ismerteti a 4 513 008 sz. USA-beli szabadalmi leírás.

A halaszt aktiv komponenciájáról, így az EPA és a DHA ω-3 sorozat bioszintézisénél prekurzorként szerepelnek, egyben gátolják az arachidonsavból kiinduló bonyolult biokémiai folyamatok láncait, az ún. „arachidonáns-kaszék” során keletkezők időös hatású meabolitok, mint például a TXA₂ és a TXB₂ képződését.

A politetiletlen zsírsavak számos kedvező hatás mellett azzal a hármasra patológiai tulajdonsággal rendelkeznek, hogy az emberi szervezetben spontán oxidačnís mechanizmus bomlást szabnak akív aldehidek, többek között a szervezet káros malonalehid keletkezésére. Ezek az aldehidek elszaporban a kötőszövegekkel eltanítanak káros reakciókat léphetnek, ami ún. „ceroid lipofuscinosis”-hoz vezethet.

Az utóbbi évtizedben kezdték foglalkozni a kutatók a mikrokolemek és nyomelemek általani hatásával, így ismertetessé vált, hogy a szélén az elét egyik legfontosabb, nélkülözhetetlen anyaga. A szélén kedvező hatásra főként azon elapszik, hogy aktiválja a glutathion-peroxidáz, pontosabban annak prosztatikus csoportját, amely a káros peroxidációs folyamatok legfontosabb endogén gátolja.

A szélén önmagában hatásos vényomáscsökkenő anyag, javítja a szív ismértsé, hipoxiás és infarktusos állapotát, megakadályozza a központi idegenrendszer elüdő lipoproteináit. Hatásai, például a „angina” kérgevulladás/escén is. Rákkellenes hatása jelentős, bizonyítottan csökken a rák kialakulásának lehetőségeit. Ezbenkívül mutatnán inhibitorikum is alkalmazható.

A szélén nem kumulatívid a szervezetben, így pót-

lásfárol ellállandó gondoskodni kell. Bevitelle mostanig fölg szervetlen vegyületeket, így SeO₂ és NaSeO₃ alakjában történ. Hosszú majnánkrózist, izomelhalást, eritrocitis membrán destruktioit, kötőszöveti károsodást eredményezhet. EKG elváltozásokat S-T eleváció, ezenkívül kwashiatikor betegséget, sclerosis multiplexet okozhat.

A szélén biológiai hatásairól összefoglaló cikket közzétette Thress és munkatársai (*Nutrition Review* 35, 7/1977), valamint Shamberger (J. of Env. Path. and Tox. 4, 305/1980) és Masukawa és munkatársai (Experientia 39, 405/1983).

Szerves szélén-vegyületeket egyszeri preparativ szinten tekinten nyernétek; ilyen megoldási ismertetének például Klaunisz és Günther: *Organic Selenium Compounds, Their Chemistry and Biology* (John Wiley and Sons, Inc. New York: 1973) c. könyvbiken, de elalfuttatások szerves szélén-vegyületek mikroorganizmusok segítésével is. Utóbbit esetben a mikroorganizmusok szervetlen szélén-vegyülettel dúsított tápközegen nevelik. Az erre alkalmas szervezetek a szelén felvételük és anyagcseréje körbe vonva szerves anyagokhoz, leggyakrabban aminosavakhoz vagy zsírokokhoz köti. Ilyen eseteket ismertetnek közelmezőkben Danch és Chmicelowsky (Pr. Nauk. Univ. Ślask Katowice, 1, 57/1985) és Gemity és munkatársai (Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 176/1984).

Számos olyan mikroorganizmus ismertes, amely képes egyes elemeket – így a szélénit is – közvetlenül összegyűjteni és szervezetben akkumulálni. A 4 530 846 sz. egyszerűtlenített szabadalmi leírás és a 60 224 451 sz. és 57 174 098 sz. japán közrebecsítési iratok szélénmel dúsított élesztőgombra eljőlliási írásuk le.

35 Az élesztő mellett egyéb mikroorganizmusok, így baktériumok, sugarcambahák és fonalasgombák szélen-

36 nel való dúsítását ismerteti a 78 148 587 sz. japán köz-

rebecsítési irat.

A szélén tartalmú élesztőt az 58 129 954 sz. japán

közrebecsítési irat szármán növényi olajokhoz keverve

öregkori megbeszélések kezelésére javasolják.

A találomány célja olyan új, a szívra és a keringési rendszerre ható gyógyszeri készítmény előállítása, mely lehetséges tesz a DHA és az EPA, valamint speciális mikroorganizmusok közreműködésével a szerves szélén-tartalmú termésekhez vegyületek előnyös tulajdonságainak egyesítését, és egyidejűleg teljes mértékben kiküszöböli a polietilenen zsírsavak hármasra utaljódnak.

50 A találomány alapjára a felismerés, hogy a fenti cél maradválytalanul elérhető, és a ceroid lipofuscinosisos folyamat kiküszöbölésére alkalmas készítmény nyerhető, ha szélén-tartalmú – humán felhasználás szempontjából nem toxikus – mikroorganizmust politetilet-

55 len zsírsavakkal együtt alkalmazunk.

A szélén-tartalmú készítményeket a szívra és a keringési rendszerre ható gyógyszeri készítmények előállítására. A találomány értelmében úgy járunk el,

hogy 0,5–50 tömeg% szélén-tartalmú mikroorganiz-

must, valamint 99,5–50 tömeg% 18–24 szénatomszám-

2

legalább két teitlenen kötést tartalmazó zsírsavakat vagy ezek származékait kívánt esetben a gyógyszerkészítésben szokás vivő- és/vagy hordozónyagokkal és kíván esetben antioxidánsnal önmagában ismert módon gyógyszerkészítményre alkutunk.

A találomány szerinti eljárásban célszerűn olyan kézszínnyeket állítunk elő, melyek ekozapentánsavat /EPA/ és dokozahexánsavat /DHA/, valamint szelén-tartalmú édeszsírt tartalmaznak.

A kézszínny egyik komponenseül szolgáló C₁₆₋₂₄ ω-3 típusú zsírsavak alapanyagaként különféle tengeri és édesvízi halakból, így elosztottan makrélából, tökehalból, beringiból, szardínióból, tintahalból és busaból, továbbá a halak húsból nyerhető olajok, például a tökehalhúsból /csuklomjalaj/ és csipamájjal használhatók.

A halolajok az EPA- és a DHA-n kívül nagyon mennyiségben tartalmaznak telített és kísérőket is tartalmazó zsírsavakat, valamint el nem szappanossítható komponenseket. Ezeken alkotórészek elszívöltsége igen fontos, hiszen a halolajokból készített gyógyszási kézszínnyek dózisának növelése érzkényen emelné a bevitt kalóriát, valamint a vér triglicerid-szintjét. Emellett az el nem szappanossítható alkotórészek tartalmazhatnak szteroidokat, például koleszterint, D-vitaminat /annak provitamináját/ és/vagy A-vitamint. A D- és az A-vitaminok az emberi szervezetben kumulálódnak, így az ilyen vitaminokat tartalmazó kézszínnyenél nem lehetséges a kívántat hatás eléréséhez szükséges tartós kezelést végezni. Ezért a halolajból elszívöltségi a felhasználók elemzékelhetik, hogy a telített és kísérőket tartalmazó zsírsavakat, az el nem szappanossítható alkotórészeket, mint például a koleszterint, az A- és D-vitamint. Íly módon a halolajban az EPA és DHA együttes mennyisége 50% fölötti dísszel.

Microorganizmusként célszerűn olyan törzseket használhatunk, amelyek humán szempontból nem toxikusak, és így emberi gyógyszerünk alkalmazásak. Erré a célra legmegfelelőbbek a biotechnológiában is széles körben alkalmazott törzsek, mint például a Lactobacillus sp., Leuconostoc sp., Pediococcus sp., Acetobacter sp., Streptococcus sp., Torula sp., Kluyveromyces sp., Candida sp., Brettanomyces sp., Brevibacterium sp., Saccharomyces sp., Torulopsis sp., Pichia sp., Hansenula sp., Oidium sp., Rhodotorula sp., Trichosporon sp., Penicillium sp., Rhizopus sp., Mucor sp., Monascus sp., Aspergillus sp. stb. fűrész fajai.

A találomány szerinti kézszínnyenél oxidiáltanak gátlásra aktív tartósítószerekkel tőlökötőrlő /E-/vitamin/, glutamion- vagy hagyományos antioxidánsokat, mint például buill-hidroxitoluolú célszerű használni.

Vivő- és hordozónyagokat a gyógyszerkészítésben szokásos anyagokat, mint például faktóz, keményítőt vagy magnézium-szteridot alkalmazhatunk.

⁴ termékhözjáró vizsgálati módszerrel: eredményes karbónát mellekhatásokról való mentességi igazolás, mert a patkányonál mikroszomális enzimkatalízserben használhatósági dózis százszoros mennyiségben sem tapasztalunk elváltozást. A kézszínnyenél történő kezelés szignifikáns módon csökken a kontrollhoz

viszonyítva a szervezetben felhalmozódó lipofuscin mennyiségeit. A találomány szerinti kézszínnyenél Wisztar módszert patkányokon végzett 6-hetes vizsgálatok alapján egyértelmű trombocita aggregáció galásiával tapasztalunk.

A kézszínny optimális hatásos napi dózisa 75 kg-os állágos testűméregek számolva 2 g. Az olaj-komponens átlagosan 22% EPA-t és 43% DHA-t tartalmaz. Az édeszsírop grammenként átlagosan 40 µg szelént tartalmaz.

A találomány szerinti kézszínny több előnyei a következők:

1. Egyesítő az EPA és a DHA, valamint a szelén és azzel össyfűzött tulajdonságait.
2. Kikiszűrőjű az ismert halolajtartalmú kézszínnyek azon káros hatásait, melyeket a telített lipoid komponensek, például szterinek, valamint az A- és D-vitamin tartalom okozhat.

3. Kikiszűrőből a politeltetlen zsírsavak fogyasztása esetén feléleső „ceroid lipofuscinosis” lehetőséget.

4. A szelén természetes anyagként mikroorganizmusban, mint pl. baktériumban, gombában, élőszínen feldúsítva tartalmazza, speciális mikroorganizmussal együtt adagolt szelén jobban felszívódik, és kedvező hatású előnyöseiből fejl ki.

5. A szerves szelén mikroorganizmusokban fgy elszaporban élőszínből ipari méretekben, fajlagosan nagymennyiségben és olcsón állítható elő.

6. Kedvező gyógyszeri hatást fejt ki atopikus zavarok esetén, és ekcema, aszma, allergiás tünetek, allergiás rhinitis és/vagy atopikus összefüggésű zavarok, például migraine, Crohn-féle betegség, fekélyes colitis, otitis media, nefrotikus szindróma, cukorbetegség preventív kezelésére is felhasználható. Külnösen alkalmass a keringési rendszer zavarai, annak apoplexiás megnyilvánulásai, trombo-embolikus állapotok, így agyérzés, infarktus, fistulkodások Keshan-szindrómája kezelésére, valamint a rendellenes állapotok kialakulásának megelőzésére.

A találomány szerinti kézszínnyelhez alkalmazott 3 politeltetlen zsírsavakat az 1. példában leírtak szerint a szelénnel döntött mikroorganizmust pedig a 2-6. példák szerint állíthatjuk elő. A 7-9. példák a találomány szerinti gyógyszeri kézszínnyek előállítását szemléltetik.

I. példa :

24 kg makrélai olajat 60 °C-on feloldunk 16 liter mestanolban 30-60 °C közötti hőmérsékleten, keverés közben 8 kg 40%-os NaOH oldatot cseppeztünk hozzá, majd az elegyet 60 °C-on tarva további 45 percig keverjük. Mintegy 60 °C-hőmérsékleten 20 kg 15%-os oldatot adunk az oldathoz. A fázisokat elválasztjuk, majd a szerves fázist még 10 kg 15%-os sósavval, majd a mintegy 70 °C-i forró csapvízzel semlegessük. Az így kialakult fázisokat ismét elválasztjuk. Az olajra fűzéshoz 100 liter acetunk, felmelegítjük mintegy 45 °C-ra, és hozzáadunk 30 liter vízben feloldott 3,8 kg LiOHxH₂O-ot. Felől órára keverdő után eljátszanak a finni hagyjuk, majd leszűrik, és az acet-

3

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a szív és a keringési rendszer tromboembolitikus állapotaira ható gyógyászati készítmények elszállítására, azzal jellemzve, hogy 0,5–50 tömeg%, előnyösen 5–35 tömeg%, célszerűen 15–25 tömeg% szelén-tartalmú ellenző-típusú mikroorganizmust, valamint 99,5–50 tömeg%, előnyösen 95–65 tömeg%, célszerűn 85–75 tömeg% 18–24 szénatomos, legalább két telítetlen kötést tartalmazó egy több zsírsvárat és/vagy ezek származékait kívánt

esetben a gyógyszerkészítésben szokás vivő- és/vagy hordozóanyagokkal és kívánt esetben anti-oxidánsnal önmagában ismert módon gyógyszerkészítményé alakítjuk.

5 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemzve, hogy telítetlen zsírsváként tengeri halak olajából extra-hál zsírsvákat használunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemzve, hogy telítetlen zsírsváként 5,8,11,14,17-ciklozapentaénsvat és 4,7,10,13,16,19-dokozahexaén-savat használunk.

10

nos szíreletet bepároljuk. Körülbelül 8 kg 15%-os sásvával megsavanyítjuk és hexánhoz hűtőszor kírunk, majd a hexános fűtést bepároljuk. A tisztítási művelet során végig N₂-atmoszférában dolgozzunk. Így 6,4 kg tisztított halolaj nyerünk.

Az így tisztított makrelolaj 1 kg-ját 60 °C-on hozzáspengetjük 3 kg karbamid 9 liter metanolnal készített oldatához. Az elegyet 2 órán át ezen a hőmérsékleten keverjük. Lehűlés után éjszakán át mélyhűtőben -10 °C-on állítjuk meg, majd leszűrik. A szíreletet bepároljuk. A bepárolt anyaghoz 2,5 liter 1:1 hígítású sósvárat öntünk, majd 15 percig keverjük. Hexánhoz kírunk, a hexános fűtést vízzel semlegesre mosunk, Na₂SO₄-tal szűrjuk, majd bepároljuk. Így 0,34 kg ω-3 telítetlen zsírvárat kapunk. Jódszám: 315; EPA-tartalom: 24%; DHA-tartalom: 42%.

2. példa:

5-litres üveg palackokba 2-2 l sterilizált maltsakváros folyékony típusával öntünk, és glükózzal (3% dúsítjuk. 5 µg/ml nátrium-szelenitet teszünk hozzá, majd beolcsitjuk *Saccharomyces cerevisiae*-vel. Levegőzettséget 32 °C-on 72 óráig neveljük. A 48. órában jább 5 µg/ml nátrium-szelenitet adunk a tenyészethez.

Szűrés után a sejtek deszszilitálási vizelle többször átmoszkálva, majd 68-70 °C-on szűrjük. Az anyagot mikronizáljuk, majd atomabszorpció módszerrel meg-határozzuk a Se-tartalmat. A kapott érték 300 µg/g.

3. példa:

500 ml-es Erlenmeyer-lombokba 100 ml élesztő-kivonatos folyékony tápoldatot tölünk sterili körülmelegyek között, majd 5 µg/ml mennyiséggű Na-szelenitet teszünk bele, és beolcsítjuk *Aspergillus sojae* gombával. 28-30 °C-on rözzük a tenyészsejteket. A tenyészés 3. napján jább 5 µg/ml Na-szelenitet teszünk a kultúrába. 5 nap eltelté után a szárnyasztókat kiszűrjük, mosunk, majd a 2. példa szerinti módon szűrjük. Mikronizálás után a minősítésben meghatározott Se-tartalma 300 µg/g.

4. példa:

A 3. példával azonos módon alkalmazzuk a *Torulopsis utilis* nevű élesztőt. A tenyészés során nyert mikrobaktérium Se-tartalma 120 µg/g.

5. példa:

A 3. példa szerinti módon elkészített tápoldaton *Streptococcus thermophilus*-t nevelünk 45 °C-on. A nevelési és kinyerési periódus után a mikroba-por Se-tartalma 420 µg/g.

6. példa:

A 3. példával azonos módon nevelünk *Lactobacillus mesenteroides* baktériumfajt. Ez esetben a tápalajt 1½ gjúrószálas és 1½ órásnak karbontartási is kiegészítjük. A kapott baktérium 300 µg/g Se-t tartalma.

7. példa:

150 g 65%-os dúsított makrelolajhoz /EPA-tart-

alom: 24%, DHA-tartalom: 42%/ 10 g Se-élesztőpör keverjük Se-koncentráció: 260 µg/g élesztőpör. A keverék homogenizáljuk. A homogenizátorot 0,1% E-vitaminmal tartósítjuk. A kapott hatóanyagot így zselatin kapszulába töltjük, és buborék-csomagolással szerezjük ki.

8. példa:

Mindenben a 7. példa szerint járunk el, azzal az eltérés, hogy az alábbi kiindulási anyagokat használjuk: 400 g 65%-os dúsított tökehalmájalaj, melynek EPA-tartalma 22%, DHA-tartalma 43%; 100 g élesztőpor 120 µg/g Se-tartalommal és 0,4 mg E-vitamin. A homogenizátorom 500 mg hatóanyag be fogadására alkalmas kapszulába töltjük.

9. példa:

Ismert gyógyszerészeti eszközökkel és eljárással az alábbi összetételi tabletákat állítjuk elő:

EPA- és DHA-ra nézve dúsított tökehalmajálai olaj, mely 0,1% E-vitamin tartósított tartalmaz (DHA-tartalma: 43%, EPA-tartalma: 22%) 200,0 mg

Se-élesztő (Se-koncentráció: 150 µg/g élesztőpor) 86,0 mg

Laktóz 140,0 mg

Kéményítő 60,0 mg

Polivinil-pirolididon 3,5 mg

Magnézium-ezzárt 3,5 mg.

30 Kívánt esetben a tabletákat drázsirózó gépen csúkarai vagy más anyaggal vonjuk be.

A trombocita aggregáció gátló hatást Wistar albino nőstény patkányok 10-es csoportjain 6 hetes p. o. kezeléssel vizsgáltuk. Az illatok I. csoportja 67% zsírsav-szármaszék és 33% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g) keverékét, a II. csoport 94% zsírsav-szármaszék és 6% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g), a III. csoport 50% zsírsav-szármaszék és 50% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g) keverékét kapta. A IV. (kontroll) 40 csoport 67% fiziológiai sóoldal és 33% élesztő (széld-mentes) keverékét kapta.

A 6 hetes kezelést követően a vena cava inferiorból véti visszah, a vérminimál 3,5%-os Na-citratral összkevertük, centrifugáltuk és a kapott, trombocita-dús plazmából, ADP különböző koncentrációival trombocita-aggregációt idéztünk el. Az a minimális ADP-koncentráció, melynél az aggregáció jelentkezik, ADP különböző koncentrációinak nevezünk. Ennek átlagos értéke (\bar{x}) a kontroll-csoportban 11,1 µ; a találomány szerinti

50 kombináció hatására ez jelentősen emelkedik, mint az alábbi tablázat mutatja:

	\bar{x} (µM)
I. csoport	64,5
II. csoport	52,3
III. csoport	88,5
IV. (kontroll)	...
A trombocita aggregáció gátló hatás jelemlés, és 50-94% zsírsav (vagy zsírsav-szármaszék) és 33-50% élesztő (Se-tartalmú élesztő) tartalmazó kombináció esetében megfelelően bizonyított.	